

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792090

研究課題名(和文) 骨リモデリングに関わる骨芽細胞の増殖・分化・機能活性における
Msx2の役割研究課題名(英文) Roles of Msx2 in osteoblast proliferation, differentiation and
activation for bone remodeling.

研究代表者

山本 芳丈 (YAMAMOTO YOSHITAKE)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：50380465

研究成果の概要(和文)：

歯科矯正治療に不可欠である骨リモデリングや再生に関わる骨芽細胞の分化制御機構に関与すると考えられる Msx2 については未だ不明な点が多い。そこで本研究ではマウス ES 細胞を用いて骨芽細胞への分化や骨形成に対する役割について検討した。Msx2 を導入した ES 細胞とフィーダー細胞を共存培養し、その分化能を検討するために ALP 染色および分化関連遺伝子の mRNA 発現、さらに石灰化能について調べた。結果より骨芽細胞の分化に対して重要な役割を担うものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：

To date, there have been no clear reports that Msx2 take part in the mechanism of osteoblast differentiation, which is responsible for the bone remodeling and regeneration in orthodontic treatments. The purpose of the present study, therefore, was to investigate the roles of Msx2 in osteoblast differentiation and bone formation with mouse Embryonic Stem cells. ES cells which transfected with Msx2 were cocultured with feeder cells, and alkaline phosphatase activity and mRNA levels of osteoblastic phenotype were determined for cell differentiation. The value of bone nodules was also determined for mineralization. As a result, it was suggested that Msx2 play a key role in controlling osteoblast differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度			
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：骨代謝

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：骨芽細胞、細胞増殖、細胞分化

1. 研究開始当初の背景

骨構成細胞における骨細胞・骨芽細胞・軟骨細胞・破骨細胞、その中でも骨の形成と吸収を担う骨芽細胞と破骨細胞の相互作用による骨リモデリングは両者のバランスが崩れると様々な骨代謝疾患を引き起こすことから、これらの細胞が治療の標的として注目され、骨研究の中でも重要な位置を占めている。

歯科矯正治療においても重要であるこの骨リモデリングには生体内における微小環境下において分化増殖する免疫系細胞のサイトカイン産生や細胞膜上の分子を介した骨格系細胞の分化や機能制御といった関与が影響を受けている。このため生体防御に伴う免疫応答や自己免疫疾患による免疫系の異常な活性化は骨代謝に直接影響を及ぼすことから骨代謝制御における重要性が認識されるようになってきた。

歯根の周囲骨組織にリモデリングが生じ、歯の移動が引き起こされる歯科矯正治療(Davidovitch et al.,1988)においても分子レベルでの免疫系による骨代謝制御機構のメカニズムの解明が期待される。

骨吸収を担う破骨細胞の分化制御には、骨芽細胞が密接に関わっており、骨吸収促進因子による破骨細胞の活性や破骨細胞分化抑制因子による分化制御については骨芽細胞を介して行われていることより、歯の移動における骨のリモデリングにおいても骨芽細胞の骨形成能と破骨細胞誘導能に注目する必要がある。

2. 研究の目的

骨芽細胞は、転写因子 Runx2 の他に様々な転写因子によりその細胞分化が制御されていると考えられているが、その詳細な機能や生理的な意義については未だ解明されていない。

転写因子の1つと考えられている Msx2 は DNA 結合タンパクであり、その標的遺伝子及び下流遺伝子についてはこれまで不明であったが、最近のノックアウトマウスを用いた研究により、個体レベルでの機能が明らかにされつつあり、骨形成における骨化の過程に障害が認められている。また、骨芽細胞の分化に重要な因子の発現が骨軟骨組織で低下していたことより、Msx2 は骨芽細胞の分

化に関与するであろうと考えられている。

しかしながら、骨芽細胞の骨形成機能における分子機構や分化制御機構に対して、どのように関与しているのかについては未だ不明な点が多く、Msx2 に関してその役割には様々な解釈が存在する。

そこで本研究では、多能性幹細胞株であるマウス ES 細胞を用いて骨芽細胞への分化および骨形成に対する Msx2 遺伝子のその役割について検討を行った。

3. 研究の方法

トランスフェクションを行っていないノーマルのマウス ES 細胞をフィーダー細胞と共存培養し、まずコントロールとしての ES 細胞培養系を樹立させ、この培養系に分化誘導因子を加えることで、骨芽細胞への分化を誘導することとした。

次に、緑色蛍光タンパク質 (GFP) で標識した Msx2 遺伝子をトランスフェクションしたマウス ES 細胞とフィーダー細胞とを培養プレート上で共存培養し、その後に増殖したマウス ES 細胞を分離して作製した EB (Embryoid Body) に分化誘導因子を加え、28 日間の培養を行った。

培養期間中の 0,14,28 日後に培養細胞を採取し、骨芽細胞への分化能について検討するため、RT-PCR 法を用いた分析用に細胞より Total mRNA を抽出した。抽出した mRNA より、Msx2 を含む骨芽細胞関連因子 (Runx2、type I collagen, osteopontin, osteocalcin) の mRNA 発現の比較検討を行った。その際、比較基準としてのコントロールとして、GAPDH の発現を用いることとした。

さらに、骨芽細胞分化マーカーとして ALP 染色を行うことでその活性について解析するため、各培養期間中における細胞を固定した。

また、この培養系では培養 28 日後の最終日にも細胞を固定し、骨芽細胞の石灰化能について検討するため、培養プレート上に形成された骨様石灰化ノジュールを Von Kossa 法によって染色し、その石灰化した面積や数についての画像解析には画像解析用イメージアナライザーソフトを用いた。

4. 研究成果

トランスフェクションを行っていないノーマルのマウス ES 細胞のみを単独で培養した結果、その培養系に骨芽細胞分化誘導因子を加えても殆ど骨様石灰化物を形成するまでには至らなかった。

そこで、まずフィーダー細胞との共存培養を行い、その後に分離した ES 細胞を用いて EB を新たに作製し、そこへ骨芽細胞分化誘導因子を添加したところ骨芽細胞への分化を誘導することに成功した。これにより、この後の研究では、この培養系を基本的な実験系として用いることで実験を進めることとした。

この実験系ではマウス ES 細胞に非ウイルスベクター法であるリポフェクション法による化学的手法を用いて Msx2 遺伝子のトランスフェクションを行った。

導入効率については生物学的手法であるウイルスベクター法には劣るが、マウス ES 細胞に遺伝子が導入されたことを確認 (GFP 陽性を顕微鏡にて確認) した上で、ノーマルのものと同様の骨芽細胞への分化誘導実験を行った。

その結果、Msx2 のトランスフェクションを行った細胞群では、培養最終日において形成された骨様石灰化ノジュールの大きさが増大し、骨形成能力が促進されたと考えられた。また、ALP 陽性細胞の分布にも変化が認められた。

つまり、ノーマルマウス ES 細胞では培養細胞において全体的に弱い活性が認められたが、トランスフェクションマウス ES 細胞では細胞が凝集した周辺に特に強い活性が認められた。

細胞の分化に対する影響について分析するために調べた骨芽細胞分化関連遺伝子の mRNA 発現についても、RT-PCR の結果、骨芽細胞の分化を促進させる傾向を示す発現パターンが示された。

これらより、骨芽細胞の分化において最も重要な転写因子 Runx2 程の大きな影響力は認められなかったものの、この発現に促進的な関与をすることで、結果として骨芽細胞の分化や機能活性を制御していることが推察された。

よって、結論として、Msx2 は骨芽細胞の分化制御および骨形成における促進因子である可能性が示唆された。

今後の展望として、マウス ES 細胞 (胚性幹細胞) の次にマウス iPS 細胞 (人工多能性幹細胞) についても同じように検証し、最終的にはヒト ES/iPS 細胞を用いて、実際の臨床への応用を検討していきたい。

それと並行して、今回の培養系にメカニカルストレスや磁場刺激等を与え、その刺激の応答に対する Msx2 の発現と変化についての検討も進めている。

メカニカルストレスは培養プレートに圧力や遠心力を負荷することで、また磁場刺激は磁束密度の高い磁場を与えることで生じさせている。特にこれらの刺激は負荷する時期が重要となるので、いくつか負荷する時期を組み合わせることで、その応答を観察する必要がある。

また、一方で In vitro での研究のみにとどまらず、In vivo での研究も必要であると考えられる。

すなわち、In vivo において、マウスやラットを用いた歯牙移動動物実験モデルにおける Msx2 の発現変化および骨関連因子との関係を明らかにするために、HE 染色や免疫染色等を用いてそれぞれの関連性についての解析を行う必要がある。

その際、破骨細胞との相互作用に関連して、骨のリモデリング時にどのような役割を果たしているのかについての検討を行うため、破骨細胞の増殖や分化、そして骨吸収機能等についての分析も今後の研究において必要となると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(1) [学会発表] (計 1 件)

① 山本芳丈 (代表)、三井薫、小賤健一郎、宮脇正一
Roles of Msx2 gene in osteoblast differentiation and osteogenesis
日本矯正歯科学会学術大会、2010 年 10 月 19 日、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 芳丈 (YAMAMOTO YOSHITAKE)
鹿児島大学・歯学総合研究科・助教
研究者番号：50380465

(2) 研究協力者

三井 薫 (MITSUI KAORU)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・講師
研究者番号：40324975

小賤 健一郎 (KOSAI KEN-ICHIRO)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：90301663